

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-278011

(43)Date of publication of application : 24. 10. 1995

(51)Int. Cl.

A61K 38/16
 // C07K 5/09
 C07K 5/093
 C07K 5/097
 C07K 5/103
 C07K 5/11
 C07K 5/113
 C07K 5/117
 C07K 7/06
 C07K 7/08
 C07K 14/47

(21)Application number : 06-085243

(71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD

(22)Date of filing : 01. 04. 1994

(72)Inventor : TOMITA MAMORU
 KAWASHIMA TAKUJI
 SHIMAMURA SEIICHI
 TAKASE MITSUNORI
 ORIGASA SHUZO

(54) THERAPEUTIC AGENT FOR ANGINA PECTORIS

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a therapeutic agent for angina pectoris, stable as a medicine due to its heat resistance, solubility in water and stability in aqueous solutions, hardly causing toxicity and side effects, having antimicrobial activities and without requiring the use of a preservative in formulation.

CONSTITUTION: This safe therapeutic agent for angina pectoris contains a peptide, obtained by hydrolyzing lactoferrin of mammals, apolactoferrin and/or the lactoferrin saturated with a metal with an acid or an enzyme and having any of specific 31 amino acid sequences, a pharmaceutically permissible derivative of the peptide, pharmaceutically permissible salts of the peptide or a mixture of two or more thereof as an active ingredient. The resultant therapeutic agent has persistent remitting actions on fit of the angina pectoris and slight side effects. Sequences expressed by formulas I to IX (R01 is an optional amino acid residue except Cys), etc., are cited as the amino acid sequence of the peptide. The therapeutic agent is parenterally administered in a dose of $\cdot 10 \mu\text{g}$ per kg body weight and orally administered in a dose of $\cdot 10\text{mg}$ per kg body weight.

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The anginal drug which makes an active principle the derivative of the peptide which has the amino acid sequence of a publication in either of the array number 1 to the array numbers 31, and these peptides permitted pharmacologically, the salts of these peptides permitted pharmacologically, or two or more sorts of such mixture.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to an anginal drug. This invention makes an active principle the peptide of the lactoferrin origin which has a specific amino acid sequence etc. in more detail, and it is related with a new anginal drug without a side effect.

[0002]

[Description of the Prior Art] Since angina is a syndrome which makes a cardinal symptom ***** which a myocardium falls and produces in the transient **** state, it may die depending on the case and it may result, it is important to carry out the remission of the symptom immediately at the time of the seizure caused by the imbalance of the initial complement of oxygen and the amount of supply. As a chemical used for the treatment of angina, the organic nitro compound, the adrenergic beta receptor antagonist, the calcium channel blocker, etc. are known. [THE pharmacology cull basis OBU therapeutics (The Pharmacological Basis of Therapeutics), the 7th edition, 806 pages, Macmillan (Macmilan), and 1985]. Moreover, substance P, atrial natriuresis hormone, etc. are discovered as matter in the living body to which a crown vessel is made to extend and a crown blood stream is made to increase, and it is [life science (Life Science). Although many matter to which crown vessels, such as the 42nd volume, 695 pages, 1987], and dipyridamole, are made to extend is also compounded, the seizure of angina has few effects and it is chiefly used for the purpose of relapse prevention of an anginal attack [THE pharmacology cull basis OBU therapeutics (The Pharmacological Basis of Therapeutics), the 7th edition, 806 pages, KUMIRAN (Macmilan), and 1985].

[0003] Although pressure of business of an organic nitro compound, especially the nitroglycerin is conventionally carried out most in clinical for the purpose of the remission of an anginal attack, it is easy to receive the first time passage effect in nitroglycerin, there is a fault with the extremely short operation persistence time, and, moreover, headache, a vertigo, the tachycardia accompanying blood pressure descent, etc. are known as a side effect. Then, it looked forward to the angina therapeutic drug which does not have these faults and moreover does not have a side effect.

[0004] On the other hand, let the fall of the S wave in a patient's electrocardiogram, and a T wave be one index in a diagnosis and treatment of angina in clinical. A therapeutic drug effective in anginal attacks, such as nitroglycerin [Japanese journal OBU pharmacology by which this method is often used for reference of an angina therapeutic drug since the fall of the S wave induced by the animal with the medicine is suppressed (The Japanese Journal of Pharmacology), The 20th volume, the 313rd page, 1970, application pharmacology, the 19th volume, the 311st page, 1980, the Japanese journal OBU pharmacology (The Japanese Journal of Pharmacology), the 63rd volume, the 35th page, 1993 and a Japanese pharmacology magazine, the 102nd volume, the 85th page, and 1993 --].

[0005] The matter which suppresses the fall of the S wave induced by the animal with the medicine is variously reported besides nitroglycerin as a result of such reference. For example, although the extract [the Japanese journal OBU pharmacology (The Japanese Journal of Pharmacology), the 20th volume, 313 pages, and 1970] of the whale heart etc. is known Many of those matter Dichloroisoproterenol [journal OBU pharmacology - and - experimental therapeutics () [The Japanese Journal of Pharmacology and Experimental] Therapeutics, the 136th volume, 327 pages, 1962], The verapamil (application pharmacology, the 19th volume, 311 pages, 1980), KRN2391 [the

Japanese journal OBU pharmacology (The Japanese Journal of Pharmacology), the 63rd vol pages, and 1993], PARONIJIPIN (a Japanese pharmacology magazine, the 102nd volume, the page, 1993) etc. is the compounded organic compound. The side effect had become a problem. Moreover, although it is known that the nitro compound of an amino acid derivative will also increase a crown blood stream (JP,2-169558,A and JP,5-221949,A), it is not shown clearly to of the S wave induced by the animal with the medicine whether it is effective.

[0006] On the other hand, much invention is indicated about the peptide which has an antibacterial action to various microorganisms. For example, phosphono tripeptide effective in a gram positive and a gram negative (JP,57-106689,A), A phosphono dipeptide derivative (JP,58-13594,A), a cyclic peptide derivative (JP,58-213744,A), The peptide which shows antibacterial and an antiviral action (JP,59-51247,A), a glycopeptide derivative (JP,60-172998,A --) effective in a polypeptide (JP,60-130599,A) effective in yeast, and a gram positive JP,61-251699,A and JP,63-44598,A, An oligopeptide effective in a gram positive (JP,62-22798,A), a peptide antibiotic (JP,62-51697,A and JP,63-17897,A) -- the antibacterial peptide (JP,2-53799,A) extracted from the corpuscle of the king crab from North America in addition to this -- There are antibacterial PEPUCHIDODO (***** No. 500084 [two to] official report) isolated from the hemolymph of a honeybee, an antibacterial peptide (JP,2-268198,A) isolated from royal jelly.

[0007] Lactoferrin is iron unity protein which exists in the body fluid of mammalian including Homo sapiens, such as milk and saliva, a tear, and mucosa secretion liquid, and it is known that an antibacterial action is shown to detrimental microorganisms, such as Escherichia coli, the Candida bacillus, and the Clostridium bacillus, [journal OBU PEDIATORIKUSU (Journal of Pediatrics), the 94th volume, the 1st page, and 1979]. Moreover, having an antibacterial action by the concentration of 0.5-30mg/ml is known to staphylococcus and the enterococcus [a journal OBU daily science (Journal of Dairy Science), the 67th volume, the 606th page, and 1984].

[0008] The artificers of this invention did not have the side effect (for example, antigenicity) which is not desirable paying attention to antibacterial [of lactoferrin], moreover, from non-decomposed lactoferrin, found out having antibacterial [strong thermal resistance and antibacterial / strong], and already performed patent application (JP,5-320068,A).

[0009] Moreover, the artificers of this invention are antibacterial peptides (JP,5-92994,A) which compound the peptide or peptide derivative which has isolation or the same amino acid sequence as those peptides for the peptide which has strong antimicrobial activity from the decomposition product of lactoferrin, and consist of 20 amino acid residues. Patent application of the antibacterial peptide (JP,5-78392,A) which consists of 11 amino acid residues, the antibacterial peptide (JP,5-148297,A) which consists of six amino acid residues, the antibacterial peptide (JP,5-1498296,A) which consists of five amino acid residues, and the antibacterial peptide (JP,5-148295,A) which consists of 3-6 amino acid residues was already carried out, respectively.

[0010] Furthermore, in the bioactive peptide of milk, it is a calcium absorption promotion peptide (hood chemical ** the 11th volume, the 33rd page, 1988) besides a growth hormone, a cell differentiation growth factor, etc. Opioid-peptide [HOPPE-ZAIRAZU Die Zeit SHURIFUTO FUYUA FIJIOROGISSHIE HEMI (Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie), the 360th volume, the 1211st page, 1979 and THE Journal of Biological Chemistry (The Journal of Biological Chemistry), The 254th volume, the 2446th page, 1979], the angiotensin converting enzyme inhibitor peptide (hood chemical ** the 11th volume, the 39th page, 1988), the peptide (JP,5-262793,A) that has gastric-acid secretion depressant action are known. It found out that there was a cerebral protective action to the derivative of the peptide which has the same amino acid sequence as the matter which hydrolyzed lactoferrin with the acid or the enzyme, or these peptides, and the artificers of this invention also already did patent application to it (Japanese Patent Application No. No. 327738 [four to]). However, it is not known that an angina curative effect is in the peptide of these lactoferrin origins, and it is not indicated by reference, either.

[0011]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] It has a continuous remission operation to an anginal attack, and, moreover, the medicine with them is not realized so that clearly from the aforementioned conventional technology. [there are few side effects and safe] This invention is made in view of the situation as above, and there are few side effects and it aims to let them offer a little and effective

angina therapeutic drug.

[0012]

[Means for Solving the Problem] This invention provides either of the array number 1 to the array numbers 31 with the anginal drug which makes an active principle the derivative of the peptide which has the amino acid sequence of a publication, and these peptides permitted pharmacologically, the salts (these may be hereafter indicated to be peptides collectively) of these peptides permitted pharmacologically, or two or more sorts of such mixture as what solves the aforementioned technical problem.

[0013] That is, with the search method which makes an index depressor effect to the fall of the S wave of the electrocardiogram induced by medication of a medicine, as a result of searching a safe angina therapeutic drug with few side effects, the artificers of this invention found out having the curative effect in which the aforementioned peptides were excellent to angina, and completed this invention. Hereafter, the composition and the desirable mode of this invention are explained in detail.

[0014] When manufacturing from lactoferrin the peptides which are the active principle of the anginal drug of this invention, the lactoferrin used as a starting material commercial lactoferrin and the mammals (for example, Homo sapiens, a cow, a sheep, and a goat --) The skim milk which is the processing object of these milk, such as a colostrum of a horse, shift milk, nature milk, and a late lactation milk The lactoferrin separated from the whey etc. by the conventional method (for example, ion exchange chromatography), It is the metal saturation or partial saturation lactoferrin which carried out the chelate of the appointment lactoferrin which carried out the deferrization of them by the hydrochloric acid, the citric acid, etc., and the appointment lactoferrin with metals, such as iron, copper, zinc, and manganese, and the preparation manufactured by commercial elegance or the well-known method can also be used.

[0015] The peptides used in this invention are the salts permitted pharmacologically or such arbitrary mixture of the derivatives of the peptides which have the peptide obtained from the decomposition product of lactoferrin by the separation means, the same amino acid sequence as this peptide, and a homology amino acid sequence, and these peptides, and these peptides, and it can also be chemically compounded by the well-known method. These peptides can be obtained by the method indicated by each invention of for example, aforementioned JP,5-92994,A, JP,5-78392,A, JP,5-148297,A, JP,5-1498296,A, and JP,5-148295,A.

[0016] The peptide obtained by the aforementioned method can illustrate the peptide which has the following amino acid sequence, its derivative, or salts as a desirable mode. For example, the peptide which has the amino acid sequence of the array numbers 1, 2, and 27, The salts or its derivative (JP,5-78392,A), the peptide that has the amino acid sequence of the array numbers 3, 4, 5, and 6, The salts or its derivative (JP,5-148297,A), the peptide that has the amino acid sequence of the array numbers 7, 8, 9, and 31, The peptide which has the salts or its derivative (JP,5-1498296,A), the array number 10, or the amino acid sequence of 21, They are the salts or its derivative (JP,5-148295,A), the peptide that has the amino acid sequence of 26, 28, 29, and 30 from the array number 22, its salts, or its derivative (JP,5-92994,A). As salts of the aforementioned peptide permitted pharmacologically, acid addition salts, such as a hydrochloride, phosphate, a sulfate, a citrate, a lactate, and a tartrate, can be illustrated, and the derivative which amidated or acylated the carboxyl group can be illustrated as a derivative.

[0017] The medical treatment agent of this invention can be processed into a tablet, a capsule, a troche agent, a syrup agent, a granule, powder, an injection agent, etc. by the well-known method, and can also be used as the medicine which gave the twist agent hide to the well-known method if needed, for example, an enteric tablet. Although the anginal drug of this invention changes with age, symptoms, etc., even if there are per weight of 1kg, it can be prescribed for the patient in taking orally at a rate of 10mg parenterally [even if few per weight of 1kg / come out / 10microg / comparatively and]. [few]

[0018] Next, the example of an examination is shown and this invention is explained in detail. the example 1 of an examination -- this examination went to the well which investigates the angina curative effect of a peptide

1) It was used at random, having divided the with an examination animal weights [220-280g]

Wistar (Wistar) system male rat (from a Japanese SLC company to purchase) into four groups (one groups [6-13]).

2) The test-method rat was anesthetized by urethane (Tokyo Chemicals company make) 1.3 mg/kg.i.p., the potential of the heart guided the 2nd time through the electrode with which the limbs were equipped was amplified with the multi-purpose recorder (Nihon Kohden Corp. make), and frequency analysis equipment (Ono Sokki Co., Ltd. make) detected the minimum value of an electrocardiogram. This was made into the value of an S wave and recorded with time with the personal computer (NEC Corp. make). The fall of an S wave *****ed and induced BASOPURESHIN(made in peptide lab) 0.5microg/kg through the cannula inserted into the femoral vein, and made the difference of the value in front of ****-ed medication, and the minimum value for 5 minutes after BASOPURESHIN medication the amount of value changes of an S wave. [0019] It dissolved in a physiological salt solution for injection (Otsuka Pharmaceutical make), and ****-ed (peptide of the array number 26 manufactured by the same method as the example 1 of reference) was prescribed for the patient at a rate of 0.5 ml/rat. Nitroglycerin (Nippon Kayaku Co., Ltd. make) was used without diluting an injection agent. Any medicine was prescribed for the patient into the femoral vein through cannula at BASOPURESHIN medication 2 quota, and the control group was medicated with a physiological salt solution. The amount of value changes of an S wave authorized the statistical significant difference by U official approval of Mann-Whitney.

3) an examination result -- the result of this examination is as being shown in Table 1 ****-ed suppressed the fall of the S wave induced by jet injection of the vasopressin, and having been more effective than the nitroglycerin of an active placebo was admitted so that clearly from Table 1. In addition, although examined about other peptides, the almost same result was obtained.

[0020]

[Table 1]

投 与 薬 物	用 量	例数	S波値の変化量 (μV)
生 理 食 塩 液		13	-135±18
ニトログリセリン	1	9	-64±12*
肥満症治療薬	0.5	8	-67±30*
	1	6	-33±13**

(注)

1) 用量の単位は、mg/kg

2) S波値の変化量の表示は、平均値±標準誤差

3) *及び**は、マン-ホイットニーのU検定により生理食塩液投与群と比較し、それぞれ5%未満及び1%未満の危険率で有意差のあることを示す

[0021] the example 2 of an examination -- this examination went to the well which investigates the angina curative effect of a peptide

1) It was used at random, having divided the with an examination animal weights [220-280g] Wistar (Wistar) system male rat (from a Japanese SLC company to purchase) into four groups (one groups [6-9]).

2) At a rate of 0.1 ml/min, carry out continuous intravenous drip infusion of the fall of a test-method S wave, and it induces isoproterenol (Nikken Chemicals make) 5microg/kg/min. The difference with the value in every minute was made into the amount of value changes of an S wave after the value in

front of test drug (peptide of array number 26 manufactured by same method as example 1 of reference) medication, and ****-ed medication, And the medicine was examined by the same method as the example 1 of an examination except for having medicated isoproterenol medication start 1 quota.

3) an examination result -- the result of this examination is as being shown in Table 2 ****-ed suppressed notably the fall of the S wave induced by isopropanal tenor's continuous intravenous drip infusion so that clearly from Table 2. In addition, although examined about other peptides, the almost same result was obtained.

[0022]

[Table 2]

投 与 薬 物	用 量	例数	薬物投与後時間 (分) と S 波幅の変化量 (μV)					
			1	2	3	4	5	6
生 理 食 塩 液		9	-32±7	-43±24	-39±15	-110±18	-131±13	-127±18
ニトログリセリン	1	6	9±7000	-3±18	-38±32	-66±36	-106±36	-98±48
ニトログリセリン	0.2	6	-6±70	-10±16	-50±18	-87±11	-113±15	-114±16
	0.5	7	-4±500	-19±18	-31±19	-18±1400	-39±1800	-10±21

(注)

- 1) 表1の注と同じ。ただし、***はマンローホワイトニーのU検定により生理食塩液投与群と比較し、0.1%未満の危険率で有意差のあることを示す

[0023] the example 3 of an examination -- this examination went to the well which investigates the angina curative effect of a peptide

1) It was used at random, having divided the with an examination animal weights [220-280g] Wistar (Wistar) system male rat (from a Japanese SLC company to purchase) into six groups (one groups [5-9]).

2) The fall of a test-method S wave was examined by the same method as the example 2 of an examination except for having carried out continuous intravenous drip infusion of dopamine (Nippon Shinyaku Co., Ltd. make) 0.5mg/kg/min, and having induced it at a rate of 0.1 ml/min.

3) an examination result -- the result of this examination is as being shown in Table 3 ****-ed (peptide of the array number 26 manufactured by the same method as the example 1 of reference) suppressed the fall of the S wave induced by the continuous intravenous drip infusion of a dopamine, and having been more effective than the nitroglycerin of standard medicine was admitted so that clearly from Table 3. In addition, although examined about other peptides, the almost same result was obtained.

[0024]

[Table 3]

投与薬物	用量	例数	薬物投与後時間 (分) とS波幅の変化量 (μV)					
			1	2	3	4	5	6
生理食塩液		9	-37±4	-10±3	-151±13	-103±21	-100±20	-101±19
ニトログリセリン	1	8	1±1000	1±600	-51±1400	-89±110	-101±100	-100±100
2,5-ジヒドロキシベンゾ酸	0.05	6	-31±10	-31±12	-112±18	-152±17	-171±19	-181±18
	0.1	6	-23±9	-11±11	-136±12	-153±17	-181±15	-187±17
	0.2	5	-1±120	31±12000	-52±110	-111±16	-126±51	-132±48
	0.3	6	-2±500	29±11000	-9±13000	-40±1800	-52±2000	-65±1800

(注)

1) 表2の値と同じ。

[0025] the example 4 of an examination -- this examination went to the well which investigates the acute toxicity of a peptide

1) It was used at random using the both sexes of the rat (from Japan SLC to purchase) of CD (SD) system of 6 weeks old of use animals, respectively, having divided the male and the female into four groups (one groups [five]).

2) per [1000 and 2000] test-method weight of 1kg, and the 4000mg peptide which came out of comparatively and which was manufactured by the same method as the example 1 of reference-- injection -- service water (Otsuka Pharmaceutical make) -- dissolving -- 4ml per weight of 100g -- it came out comparatively, single time forcible internal use was carried out using the needle with a metal ball, and acute toxicity was examined

3) an examination result -- the result of this examination is as being shown in Table 4 The example of death was not accepted in the group which prescribed this peptide for the patient at a rate of 1000mg [kg]/and 2000mg/kg so that clearly from Table 4. Therefore, LD50 of this peptide is 2000mg/kg or more, and the very low thing made toxicity clear. In addition, although examined about other peptides, the almost same result was obtained.

[0026]

[Table 4]

用量 (mg/kg)	死亡数/例数	
	雄	雌
0	0/5	0/5
1000	0/5	0/5
2000	0/5	0/5
4000	5/5	5/5

[0027] Cow lactoferrin (sigma company make) 50mg of example of reference 1 marketing was dissolved in 0.9ml of purified waters, pH was adjusted to 2.5 with the hydrochloric acid of 0.1 conventions, pig pepsin (sigma company make) 1mg of back marketing was added, and it hydrolyzed at 37 degrees C for 6 hours. Subsequently, adjusted pH to 7.0 by the sodium hydroxide of a decinormal, and heated for 10 minutes at 80 degrees C, the enzyme was made to deactivate, it cooled

to the room temperature, at long-intervals heart separation was carried out by 15,000rpm for 30 minutes, and the transparent supernatant liquid was obtained. The vacuum drying of the fraction which applies 100micro of this supernatant liquid 1 to the high performance chromatography using TSK gel ODS-120T (TOSOH CORP. make), is eluted in 20% acetonitrile which contains TFA (trifluoroacetic acid) 0.05% for 10 minutes after sample pouring by the 0.8ml rate of flow for /, is eluted in the gradient of 20 - 60% of acetonitrile which contains TFA 0.05% for 30 minutes the back, and is eluted in 24 - 25 minutes was collected and carried out. The fractions which dissolve this dry matter in a purified water by 2% (W/V) of concentration, are missing from the high performance chromatography using TSK gel ODS-120T (TOSOH CORP. make) again, are eluted in 24% acetonitrile which contains TFA 0.05% for 10 minutes after sample pouring by the 0.8ml rate of flow for /, are eluted in the gradient of 24 - 32% of acetonitrile which contains TFA 0.05% for 30 minutes the back, and are eluted in 33.5 - 35.5 minutes were collected. The above-mentioned operation was repeated 25 times, and carried out the vacuum drying, and peptide about 1.5mg was obtained.

[0028] The above-mentioned peptide was understood an added water part with 6-N hydrochloric acid, and the amino acid composition was analyzed by the conventional method using the amino acid analyzer. 25 times of Edman degradation was performed for the same sample using gaseous-phase seeking ENSA - (applied biotechnology systems company make), and the array of 25 amino acid residues was determined. Moreover, it checked that a disulfide bond existed by the disulfide-bond analysis method [Analytical Biochemistry (Analytical Biochemistry), the 67th volume, the 493rd page, and 1975] using DTNB [a 5 and 5-dithio-screw (2-nitrolycerine benzoic acid)].

[0029] Consequently, having the amino acid sequence of the array number 26 which this peptide consisted of 25 amino acid residues, the 3rd and the 20th cysteine residue carried out the disulfide bond, two amino acid residues combined with the N terminus side from the 3rd cysteine residue, and five amino acid combined with C-end side from the 20th cysteine residue, respectively was checked. Example of reference 2 peptide automatic synthesizer unit (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc. make.) Based on the solid phase peptide synthesis method [journal OBU chemical society Perkin I (Journal of Chemical Society Perkin I), the 538th page, and 1981] by German shepherd etc., the peptide was compounded as follows using LKBBiolynx4170.

[0030] Amino acid [less-or-equal Fmoc-amino acid or Fmoc which protected the amine functional group by 9-fluorenyl methoxycarbonyl group - Added N and N-dicyclohexylcarbodiimide to] which may be indicated to be the name (for example, Fmoc-asparagine) of peculiar amino acid, it was made to generate the anhydride of desired amino acid, and this Fmoc-amino acid anhydride was used for composition. In order to manufacture a peptide chain, the Fmoc-asparagine anhydride equivalent to the asparagine residue of C-end is fixed to a URUTOROSHIN A resin (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc. make) by making a dimethylamino pyridine into a catalyst through the carboxyl group. Subsequently, this resin is washed by the dimethylformamide containing a piperidine, and the protective group of the amine functional group of C-end amino acid is removed. Distributor shaft coupling of the Fmoc-arginine anhydride which is equivalent to the 2nd from C-end of an after amino acid sequence was carried out to the deprotection amine functional group of the arginine fixed to the resin through the aforementioned C-end amino acid residue. The glutamine, the tryptophan, the glutamine, and the phenylalanine were fixed one by one like the following. After distributor shaft coupling of all amino acid was completed and the peptide chain of a desired amino acid sequence was formed, TFA, 5% phenol, and the solvent that consists of an ethanediol 1% performed removal of protective groups other than an acetamide methyl, and desorption of a peptide 94%, the high performance chromatography refined the peptide, this solution was condensed, it dried and peptide powder was obtained.

[0031] The amino acid composition was analyzed by the conventional method using the amino acid analyzer about the aforementioned peptide, and it checked having the amino acid sequence of the array number 10.

[0032]

[Example] Next, although an example is shown and this invention is explained still in detail and concretely, this invention is not limited to the following examples.

an example -- 1mg of peptide powder of the array number 26 manufactured by the same method as the example 1 of reference to 1ml (Otsuka Pharmaceutical make) of service water 1 ****, and 9mg

of sodium chlorides (product made from the Wako Pure Chem industry) -- it came out comparatively, and dissolved, filtration sterilization of the pH was adjusted and carried out to about 7 with the sodium hydroxide (Wako Pure Chem industrial company make) and the hydrochloric acid (Wako Pure Chem industrial company make), it filled up ampul with 1ml at a time by the conventional method, and the example 2 injection -- the method same to 1ml (Otsuka Pharmaceutical make) of service water as the example 2 of reference. It dissolved at a 10mg [of peptide powder of the manufactured array number 10], and D-mannite (Wako Pure Chem industrial company make) 49.5mg rate, filtration sterilization of the pH was adjusted and carried out to about 7 in the solution of phosphoric-acid buffer powder (Wako Pure Chem industrial company make), and it filled up the vial bottle with 1ml at a time by the conventional method, and it freeze-dried and the angina therapeutic drug for injection was manufactured.

The angina therapeutic drug of the tablet which consists of the following composition per example 31 lock was manufactured by the following method.

[0033]

Peptide of the dividend number 26 10.0 (mg)

Lactose monohydrate (Wako Pure Chem industrial company make) 30.0 Corn starch (Wako Pure Chem industrial company make) 19.8 Crystalline cellulose (Asahi Chemical Industry Co., Ltd. make) 28.0 Magnesium-silicate 5 hydrate (Wako Pure Chem industrial company make) 2.0 Magnesium stearate (Wako Pure Chem industrial company make) The same method as the example 1 of 0.2 reference. It kneads into the mixture of the peptide of the manufactured array number 26, a lactose monohydrate, corn starch, and a crystalline cellulose uniformly, adding a sterilized pure water suitably, and it was dried at 50 degrees C for 3 hours, and magnesium-silicate 5 hydrate and the magnesium stearate were added to the obtained dry matter, and it mixed to it, and tableted with the tableting vessel by the conventional method.

[0034]

[Effect of the Invention] The effect of this invention relating to the anginal drug which makes peptides an active principle, and being done so by this invention is as follows as explained in detail above. (1) There are few toxicity and side effects.

(2) There is thermal resistance; and in water, it is fusibility and is stable as eye a stable hatchet and a medicine in solution.

(3) Since a peptide has an antibacterial action, it does not need to use antiseptics in tablet-izing.

[0035]

[Layout Table]

array number: -- length [of one array]: -- mold [of 11 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0036]

array: -- Lys R01 R01 R01 R01 Gln R01 R01 Met Lys Lys1 5 10 array number: -- length [of two arrays]: -- mold [of 11 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0037]

array: -- Lys R01 R01 R01 R01 Gln R01 R01 Met Arg Lys1 5 10 array number: -- length [of three arrays]: -- mold [of six arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0038]

array: -- Arg R01 R01 R01 R01 Arg1 5 array number: -- length [of four arrays]: -- mold [of six arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the

following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0039]

array: -- Lys R01 R01 R01 R01 Arg1 5 array number: -- length [of five arrays]: -- mold [of six arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0040]

array: -- Lys R01 R01 R01 R01 Lys1 5 array number: -- length [of six arrays]: -- mold [of six arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0041]

array: -- Arg R01 R01 R01 R01 Lys1 5 array number: -- length [of seven arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0042]

array: -- Arg R01 R01 R01 Arg1 5 array number: -- length [of eight arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0043]

array: -- Lys R01 R01 R01 Arg1 5 array number: -- length [of nine arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and is R01. Cys The arbitrary amino acid residues to remove are shown.

[0044]

array: -- Arg R01 R01 R01 Lys1 5 array number: -- length [of ten arrays]: -- mold [of six arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation

[0045]

array [:P] he Gln Trp Gln Arg Asn1 5 array number: -- length [of 11 arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation

[0046]

array [:P] he Gln Trp Gln Arg1 5 array number: -- length [of 12 arrays]: -- mold [of four arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation

[0047]

array: -- Gln Trp Gln Arg1 array number: -- length [of 13 arrays]: -- mold [of three arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation

[0048]

array: -- Trp Gln Arg1 array number: -- length [of 14 arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation

[0049]

array: -- Arg Arg Trp Gln Trp1 5 array number: -- length [of 15 arrays]: -- mold [of four arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation

[0050]

array: -- Arg Arg Trp Gln1 array number: -- length [of 16 arrays]: -- mold [of four arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation

[0051]

array: -- Trp Gln Trp Arg1 array number: -- length [of 17 arrays]: -- mold [of three arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation

[0052]

array: -- Gln Trp Arg1 array number: -- length [of 18 arrays]: -- mold [of six arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation

[0053]

array: -- Leu Arg Trp Gln Asn Asp1 5 array number: -- length [of 19 arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation

[0054]

array: -- Leu Arg Trp Gln Asn1 5 array number: -- length [of 20 arrays]: -- mold [of four arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and peptide which contains this peptide as fragmentation

[0055]

array: -- Leu Arg Trp Gln1 array number: -- length [of 21 arrays]: -- mold [of three arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation

[0056]

array: -- Arg Trp Gln1 array number: -- length [of 22 arrays]: -- mold [of 20 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and they are No. 2. Cys and No. 19 Cys is carrying out the disulfide bond.

[0057]

Array: Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro 1 5 10 15 Ser Ile Thr Cys Val 20 array number: -- length [of 23 arrays]: -- mold [of 20 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- let this peptide and this peptide be fragmentation The included peptide. In order that Cys* may prevent formation of a disulfide bond in the following array, the cysteine which embellished the thiol group chemically is shown.

[0058]

Array: Lys Cys* Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro 1 5 10 15 Ser Ile Thr Cys* Val 20 array number: -- length [of 24 arrays]: -- mold [of 20 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- let this peptide and this peptide be fragmentation The included peptide. It sets in the following array and they are No. 2. Cys and No. 19 Cys is carrying out the disulfide bond.

[0059]

Array: Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro 1 5 10 15 Pro Val Ser Cys Ile 20 array number: -- length [of 25 arrays]: -- mold [of 20 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- let this peptide and this peptide be fragmentation The included peptide. In order that Cys* may prevent formation of a disulfide bond in the following array, the cysteine which embellished the thiol group chemically is shown.

[0060]

Array: Lys Cys* Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro 1 5 10 15 Pro Val Ser Cys* Ile 20 array number: -- length [of 26 arrays]: -- mold [of 25 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- let this peptide and this peptide be fragmentation The included peptide. It sets in the following array and they are No. 3. Cys and No. 20 Cys is carrying out the disulfide bond.

[0061]

Array: Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala 1 5 10 15 Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe 20 25 array number: -- length [of 27 arrays]: -- mold [of 11 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- let this peptide and this peptide be fragmentation The included peptide.

[0062]

配列:

Lys Thr Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys

1

5

10

array number: -- length [of 28 arrays]: -- mold [of 38 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- this peptide and the peptide which contains this peptide as fragmentation It sets in the following array and they are No. 16. Cys and No. 33 Cys is carrying out the disulfide bond.

[0063]

Array: Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys 1 5 10 15 Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser 20 25 30 Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe 35 array number: -- length [of 29 arrays]: -- mold [of 32 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- let this peptide and this peptide be fragmentation The included peptide. It sets in the following array and they are No. 10. Cys and No. 27 Cys is carrying out the disulfide bond.

[0064]

Array: Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp 1 5 10 15 Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg 20 25 30 Ala Phe array number: -- length [of 30 arrays]: -- mold [of 47 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- let this peptide and this peptide be fragmentation The included peptide. In the following array, it is the length 36 of an array, and they are No. 9, No. 26, and No. 35. No. 9 of the peptide which has Cys Cys and No. 26 Cys carries out a disulfide bond and they are No. 35 of the peptide of the length 36 of the above-mentioned array. No. 10 of the peptide to which Cys is the length 11 of an array and has Cys in No. 10 Cys is carrying out the disulfide bond.

[0065]

Array: Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn 1 5 10 15 Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp 20 25 30 Ser Pro Ile Gln Cys Ile 35 Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala 1 5 10 array number: -- length [of 31 arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- feature [of a peptide array]: -- let this peptide and this peptide be fragmentation The included peptide. It sets in the following array and is R01. The arbitrary amino acid residues except Cys are shown.

[0066]

Array: Lys R01 R01 R01 Lys 1 5.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-278011

(43) 公開日 平成7年(1995)10月24日

(51) Int.Cl. ^o	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/16	ABS			
// C 0 7 K 5/09		8318-4H		
5/093				
5/097				

A 6 1 K 37/ 14 ABS

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-85243

(22) 出願日 平成6年(1994)4月1日

(71) 出願人 000006127

森永乳業株式会社

東京都港区芝5丁目33番1号

(72) 発明者 富田 守

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業
株式会社食品総合研究所内

(72) 発明者 川島 拓司

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業
株式会社食品総合研究所内

(72) 発明者 島村 誠一

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業
株式会社食品総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 狭心症治療剤

(57) 【要約】

【構成】 配列番号から配列番号31のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド、薬学的に許容されるこれらペプチドの誘導体、薬学的に許容されるこれらペプチドの塩類、またはこれらの2種以上の混合物を有効成分とする狭心症治療剤。

【効果】 毒性および副作用が少なく、耐熱性があり、水に可溶性であり、水溶液中で安定なので、薬剤として安定であり、ペプチドは抗菌作用を有するので、製剤化に当り防腐剤を使用する必要がない。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1から配列番号31のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド、薬学的に許容されるこれらペプチドの誘導体、薬学的に許容されるこれらペプチドの塩類、またはこれらの2種以上の混合物を有効成分とする狭心症治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、狭心症治療剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は特定のアミノ酸配列を有するラクtofelin由来のペプチド等を有効成分とし、副作用のない新しい狭心症治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】狭心症は、心筋が一過性虚血状態に陥り生じる疼痛発作を主徴とする症候群であり、場合によっては死に至ることもあるので、酸素の必要量と供給量との不均衡により惹起される発作時に、直ちに症状を緩解させることが肝要である。狭心症の治療に使用される薬品としては、有機ニトロ化合物、アドレナリン β 受容体拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断薬等が知られている[ザ・ファーマコロジカル・ベシス・オブ・セラピューティクス(The Pharmacological Basis of Therapeutics)、第7版、806ページ、マクミラン(Macmillan)社、1985年]。また、冠血管を拡張させて冠血流量を増加させる生体内物質としてサブスタンスP、心房性ナトリウム利尿ホルモン等が発見され[ライフ・サイエンス(Life Science)、第42巻、695ページ、1987年]、ジピリダモール等の冠血管を拡張させる物質も多数合成されているが、狭心症の発作には効果が少なく、専ら狭心症発作の再発防止の目的で使用されているにすぎない[ザ・ファーマコロジカル・ベシス・オブ・セラピューティクス(The Pharmacological Basis of Therapeutics)、第7版、806ページ、マクミラン(Macmillan)社、1985年]。

【0003】従来、狭心症発作の緩解を目的として、有機ニトロ化合物、特にニトログリセリンが臨床において最も薬用されているが、ニトログリセリンには初回通過効果を受け易く、作用持続時間が極端に短い欠点があり、しかも副作用として頭痛、めまい、血圧下降に伴う頻脈等が知られている。そこで、これらの欠点がなく、しかも副作用のない狭心症治療薬が特望されていた。

【0004】一方、臨床において、患者の心電図におけるS波およびT波の低下は、狭心症の診断および治療における一つの指標とされており、ニトログリセリン等の狭心症発作に有効な治療薬は、薬物により動物に誘発されたS波の低下を抑制するので、この方法が狭心症治療薬の検索にしばしば用いられている[ザ・ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー(The Japanese Journal of Pharmacology)、第20巻、第313ページ、1970年、応用薬理、第19巻、第311ページ、1980年、ザ・ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー(The Japanese Journal of Pharmacology)、第63巻、第35ページ、1993年および日本薬理学雑誌、第102巻、第85ページ、1993年]。

2

【0005】このような検索の結果、薬物により動物に誘発されたS波の低下を抑制する物質が、ニトログリセリン以外にも種々報告されている。例えば、鯨心臓の抽出物[ザ・ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー(The Japanese Journal of Pharmacology)、第20巻、313ページ、1970年]等も知られているが、それらの物質の多くは、ジクロロイソプロテレノール[ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスペリメンタル・セラピューティクス(The Japanese Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics)、第136巻、327ページ、1962年]、ペラバミル(応用薬理、第19巻、311ページ、1980年)、KRN2391[ザ・ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー(The Japanese Journal of Pharmacology)、第63巻、35ページ、1993年]、パロニジピン(日本薬理学雑誌、第102巻、第85ページ、1993年)等の合成された有機化合物であり、副作用が問題となっていた。また、アミノ酸誘導体のニトロ化合物も冠血流量を増加することが知られているが(特開平2-169558号公報及び特開平5-221949号公報)、薬物により動物に誘発されたS波の低下に対して有効であるか否かが明らかにされていない。

【0006】一方、種々の微生物に対して抗菌作用を有するペプチドについては、多数の発明が開示されている。例えば、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に有効なホスホトリペプチド(特開昭57-106689号公報)、ホスホジペプチド誘導体(特開昭58-13594号公報)、環状ペプチド誘導体(特開昭58-213744号公報)、抗菌および抗ウイルス作用を示すペプチド(特開昭59-51247号公報)、酵母に有効なポリペプチド(特開昭60-130599号公報)、グラム陽性菌に有効な糖ペプチド誘導体(特開昭60-172998号公報、特開昭61-251699号公報および特開昭63-44598号公報)、グラム陽性菌に有効なオリゴペプチド(特開昭62-22798号公報)、ペプチド系抗生物質(特開昭62-51697号公報および特開昭63-17897号公報)その他北米産カプトガニの血球から抽出した抗菌性ペプチド(特開平2-53799号公報)、蜜蜂の血リンパから単離した抗菌性ペプチド(特表平2-500084号公報)、ロイヤルゼリーから単離した抗菌ペプチド(特開平2-268198号公報)等がある。

【0007】ラクtofelinは、乳汁および唾液、涙、粘膜分泌液などのヒトを含む哺乳動物の体液に存在する

鉄結合性タンパク質であり、大腸菌、カンジダ菌、クロストリジウム菌等の有害微生物に対して抗菌作用を示すことが知られている〔ジャーナル・オブ・ペディアトリクス(Journal of Pediatrics)、第94巻、第1ページ、1979年〕。また、ブドウ球菌および腸球菌に対して、0.5~30mg/mlの濃度で抗菌作用を有することが知られている〔ジャーナル・オブ・デュー・サイエンス(Journal of Dairy Science)、第67巻、第606ページ、1984年〕。

【0008】この発明の発明者らは、ラクトフェリンの抗菌性に着目し、哺乳類のラクトフェリン、アボラクトフェリン、および/または金属飽和ラクトフェリン(以下、これらをラクトフェリン類と記載することがある)を酸または酵素により加水分解した物質が、望ましくない副作用(例えば抗原性)等がなく、しかも未分解のラクトフェリン類よりも強い耐熱性および抗菌性を有することを見出し、既に特許出願を行った(特開平5-320068号公報)。

【0009】また、この発明の発明者らは、ラクトフェリンの分解物から強い抗菌活性を有するペプチドを単離、若しくはそれらのペプチドと同一のアミノ酸配列を有するペプチドまたはペプチド誘導体を合成し、20個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-92994号公報)、11個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-78392号公報)、6個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-148297号公報)、5個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-1498296号公報)、3~6個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-148295号公報)を、それぞれ既に特許出願した。

【0010】さらに、乳汁の生理活性ペプチドには、成長ホルモン、細胞分化増殖因子等の他に、カルシウム吸収促進ペプチド(フードケミカル、第11巻、第33ページ、1988年)、オピオイドペプチド[ホッパー・ツァイトシュリフト・フュアー・フィジオリシス(Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie)、第360巻、第1211ページ、1979年およびザ・ジャーナル・オブ・バイオリジカルケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)、第254巻、第2446ページ、1979年]、アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド(フードケミカル、第11巻、第39ページ、1988年)、胃酸分泌抑制作用を有するペプチド(特開平5-262793号公報)等が知られている。この発明の発明者らも、ラクトフェリン類を酸または酵素により加水分解した物質と同一のアミノ酸配列を有するペプチドまたはこれらペプチドの誘導体に腸の保護作用のあることを見出し、既に特許出願した(特開平4-327738号)。しかしながら、これらのラクトフェリン由来のペプチドに狭心症治療効果のあることは知られておらず、文献に

も記載されていない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】前記従来技術から明らかなように、狭心症発作に対して持続的な緩解作用を有し、しかも副作用が少なく安全な薬剤は実現されていない。この発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、副作用が少なく、少量で有効な狭心症治療薬を提供することを目的としている。

【0012】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記の課題を解決するものとして、配列番号1から配列番号31のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド、薬学的に許容されるこれらペプチドの誘導体、薬学的に許容されるこれらペプチドの塩類(以下、これらをまとめてペプチド類と記載することがある)、またはこれらの2種以上の混合物を有効成分とする狭心症治療剤を提供する。

【0013】すなわち、この発明の発明者らは、薬物の投与により誘発される心電図のS波の低下に対する抑制効果を指標とする検索方法により、副作用の少ない安全な狭心症治療薬を検索した結果、前記ペプチド類が狭心症に対し優れた治療効果を有することを見出し、この発明を完成した。以下、この発明の構成および好ましい態様について詳しく説明する。

【0014】この発明の狭心症治療剤の有効成分であるペプチド類をラクトフェリン類から製造する場合、出発物質として使用するラクトフェリン類は、市販のラクトフェリン、哺乳類(例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ)の初乳、移行乳、常乳、末期乳等、またはこれらの乳の処理物である脱脂乳、ホエー等から常法(例えば、イオン交換クロマトグラフィー)により分離したラクトフェリン、それらを塩酸、クエン酸等により脱鉄したアボラクトフェリン、アボラクトフェリンを鉄、銅、亜鉛、マンガン等の金属でキレートした金属飽和または部分飽和ラクトフェリンであり、市販品または公知の方法により製造した調製品を使用することもできる。

【0015】この発明において使用するペプチド類は、ラクトフェリン類の分解物から分離手段によって得られるペプチド、このペプチドと同一のアミノ酸配列、相同なアミノ酸配列を有するペプチド、これらのペプチドの誘導体、これらのペプチドの薬学的に許容される塩類またはこれらの任意の混合物であり、公知の方法により化学的に合成することもできる。これらのペプチド類は、例えば、前記特開平5-92994号公報、特開平5-78392号公報、特開平5-148297号公報、特開平5-1498296号公報および特開平5-148295号公報の各発明に記載された方法によって得ることができる。

【0016】前記の方法によって得られるペプチドは次のアミノ酸配列を有するペプチド、その誘導体または塩

類を望ましい態様として例示できる。例えば、配列番号1、2及び27のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類またはその誘導体（特開平5-78392号公報）、配列番号3、4、5および6のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類またはその誘導体（特開平5-148297号公報）、配列番号7、8、9及び31のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類またはその誘導体（特開平5-1498296号公報）、配列番号10乃至21のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類またはその誘導体（特開平5-148295号公報）、配列番号22から26、28、29および30のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類またはその誘導体（特開平5-92994号公報）である。前記ペプチドの薬学的に許容される塩類としては、塩酸塩、リン酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩等の酸付加塩を例示でき、誘導体としては、カルボキシル基をアミド化またはアシル化した誘導体を例示することができる。

【0017】この発明の治療剤は、公知の方法により錠剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、顆粒剤、散剤、注射剤等に加工することができ、必要に応じて公知の方法により剤皮を施した薬剤、例えば腸溶被錠とすることもできる。この発明の狭心症治療剤は、年齢、症状等により異なるが、体重1kg当たり少なくとも10μgの割合で経口的に、あるいは、体重1kg当たり少なくとも10mgの割合で経口的に投与できる。

【0018】次に試験例を示してこの発明を詳しく説明する。

試験例1

この試験は、ペプチドの狭心症治療効果を調べるために30行った。

1) 試験動物

体重220～280gのウイスター(Wistar)系雄性ラット（日本SLC社から購入）を、無作為に4群（1群6～13匹）に分けて使用した。

2) 試験方法

ラットをウレタン（東京化成社製）1.3mg/kg i. p. で麻酔し、四肢に装着した電極を介して第2誘導した心臓の電位を多用途記録計（日本光電社製）で増幅し、周波数解析装置（小野測器社製）で心電図の最小値を検出した。これをS波の値とし、パーソナルコンピュータ（日本電気社製）で経時的に記録した。S波の低下は、バソプレシン（ペプチド研究所製）0.5μg/kgを大腿静脈内に挿入したカニューレを介して急速注入して誘発し、被検薬投与直前の値とバソプレシン投与後5分間の最小値との差をS波の値の変化量とした。

【0019】被検薬（参考例1と同一の方法により製造した配列番号26のペプチド）は、注射用生理食塩液（大塚製薬社製）に溶解し、0.5ml/ratの割合で投与した。ニトログリセリン（日本化薬社製）は注射剤を希釈せずに用いた。いずれの薬物もカニューレを介して大腿静脈内にバソプレシン投与2分前に投与し、対照群には生理食塩液を投与した。S波の値の変化量は、マン-ホイットニーのU検定により統計学的な有意差の検定を行った。

3) 試験結果

この試験の結果は、表1に示すとおりである。表1から明らかなように、被検薬はバソプレシンの急速注入により誘発されたS波の低下を抑制し、標準薬のニトログリセリンより有効であることが認められた。尚、他のペプチド類についても試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0020】

【表1】

投 与 薬 物	用 量	例 数	S波値の変化量 (μV)
生 理 食 塩 液		13	-135 \pm 18
ニトログリセリン	1	9	-64 \pm 12*
配列番号260ペプチド	0.5	8	-67 \pm 30*
	1	6	-33 \pm 13**

(注)

- 1) 用量の単位は、mg/kg
- 2) S波値の変化量の表示は、平均値 \pm 標準誤差
- 3) *及び**は、マンロー・ホイットニーのU検定により生理食塩液投与群と比較し、それぞれ5%未満及び1%未満の危険率で有意差のあることを示す

【0021】試験例2

この試験は、ペプチドの狭心症治療効果を調べるために行った。

1) 試験動物

体重220~280gのウィスター(Wistar)系雄性ラット(日本SLC社から購入)を、無作為に4群(1群6~9匹)に分けて使用した。

2) 試験方法

S波の低下はイソプロテレノール(日研化学製)5 μ g/kg/minを0.1ml/minの割合で持続注入して誘発し、被検薬物(参考例1と同一の方法により製造した配列番号26のペプチド)投与直前の値と被検薬*

*投与後1分毎の値との差をS波の値の変化量としたこと、および薬物はイソプロテレノール投与開始1分前に投与したことを除き、試験例1と同一の方法により試験した。

3) 試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなように、被検薬はイソプロテレノールの持続注入により誘発されたS波の低下を顕著に抑制した。尚、他のペプチド類についても試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0022】

【表2】

投 与 薬 物	用 量	例 数	薬物投与後時間(分)とS波値の変化量(μV)					
			1	2	3	4	5	6
生 理 食 塩 液		9	-32 \pm 7	-45 \pm 14	-39 \pm 15	-110 \pm 18	-131 \pm 13	-127 \pm 18
ニトログリセリン	1	6	9 \pm 7***	-3 \pm 18	-38 \pm 32	-66 \pm 36	-106 \pm 36	-98 \pm 43
配列番号260ペプチド	0.2	6	-6 \pm 7*	-10 \pm 16	-50 \pm 18	-67 \pm 11	-113 \pm 15	-114 \pm 16
	0.5	7	-4 \pm 5**	-19 \pm 18	-32 \pm 19	-11 \pm 14**	-39 \pm 18**	-70 \pm 21

(注)

- 1) 表1の注と同じ。ただし、***はマンロー・ホイットニーのU検定により生理食塩液投与群と比較し、0.1%未満の危険率で有意差のあることを示す

【0023】試験例3

※50※この試験は、ペプチドの狭心症治療効果を調べるために

行った。

1) 試験動物

体重220～280gのウイスター(Wistar)系雄性ラット(日本SLC社から購入)を、無作為に6群(1群5～9匹)に分けて使用した。

2) 試験方法

S波の低下はドーパミン(日本新薬社製)0.5mg/kg/minを0.1ml/minの割合で持続注入して誘発したことを除き、試験例2と同一の方法により試験した。

*3) 試験結果

この試験の結果は、表3に示すとおりである。表3から明らかなように、被検薬(参考例1と同一の方法により製造した配列番号26のペプチド)は、ドーパミンの持続注入により誘発されたS波の低下を抑制し、標準薬のニトログリセリンより有効であることが認められた。尚、他のペプチド類についても試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0024】

*10 【表3】

投与薬物	用量	例数	薬物投与後時間(分)とS波値の変化量(μV)					
			1	2	3	4	5	6
生理食塩液		9	-37±4	-18±5	-151±23	-183±23	-198±21	-191±13
ニトログリセリン	1	8	7±1000	5±500	-51±100	-89±210	-101±180	-100±180
配列番号26ペプチド	0.05	6	-30±10	-31±12	-143±38	-162±37	-173±39	-181±36
	0.1	6	-23±1	-11±11	-136±22	-165±17	-181±15	-167±17
	0.2	5	-8±120	31±1200	-52±310	-117±16	-128±11	-112±18
	0.5	6	-2±500	29±1100	-9±13000	-40±1800	-52±2000	-45±1900

(注)

1) 表2の柱と同じ。

【0025】試験例4

この試験は、ペプチドの急性毒性を調べるために行った。

1) 使用動物

6週齢のCD(SD)系のラット(日本SLC社から購入)の両性を用い、雄および雌を無作為にそれぞれ4群(1群5匹)に分けて使用した。

2) 試験方法

体重1kg当たり1000、2000および4000mgの割合で参考例1と同一の方法で製造したペプチドを注射用水(大塚製薬社製)に溶解し、体重100g当たり4mlの割合で金属製玉付き針を用いて単回強制経口投与し、急性毒性を試験した。

3) 試験結果

この試験の結果は、表4に示すとおりである。表4から明らかなように、このペプチドを1000mg/kgおよび2000mg/kgの割合で投与した群に死亡例は認められなかった。従って、このペプチドのLD50は、2000mg/kg以上であり、毒性は極めて低いことが判明した。尚、他のペプチド類についても試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0026】

【表4】

※

30

用量 (mg/kg)	死亡数/例数	
	雄	雌
0	0/5	0/5
1000	0/5	0/5
2000	0/5	0/5
4000	5/5	5/5

40 【0027】参考例1

市販のウシ・ラクトフェリン(シグマ社製)50mgを精製水0.9mlに溶解し、0.1規定の塩酸でpHを2.5に調整し、のち市販のブタペプシン(シグマ社製)1mgを添加し、37℃で6時間加水分解した。次いで0.1規定の水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、15,000rpmで30分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清100μlをTSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマト

*50 トグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入

後10分間0.05%TFA(トリフルオロ酢酸)を含む20%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む20~60%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、24~25分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を2%(W/V)の濃度で精製水に溶解し、再度TSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFAを含む24%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む24~32%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、33.5~35.5分の間に溶出する画分を集めた。上記の操作を25回反復し、真空乾燥し、ペプチド約1.5mgを得た。

【0028】上記のペプチドを6N塩酸で加水分解し、アミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析した。同一の試料を気相シーケンサー(アプライド・バイオシステムズ社製)を用いて25回のエドマン分解を行ない、25個のアミノ酸残基の配列を決定した。またDTNB[5, 5-ジチオビス(2-ニトロベンゾイック・アシド)]を用いたジスルフィド結合分析法[アナリティカル・バイオケミストリー(A analytical Biochemistry)、第67巻、第493頁、1975年]によりジスルフィド結合が存在することを確認した。

【0029】その結果、このペプチドは、25個のアミノ酸残基からなり、3番目と20番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、3番目のシステイン残基からN-末端側に2個のアミノ酸残基が、20番目のシステイン残基からC-末端側に5個のアミノ酸がそれぞれ結合した、配列番号26のアミノ酸配列を有していることが確認された。

参考例2

ペプチド自動合成装置(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製。LKB Bio lyn x4170)を用い、シェパード等による固相ペプチド合成法[ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティー・パーキンI(Journal of Chemical Society Perkin I)、第538頁、1981年]に基づいてペプチドを次のようにして合成した。

【0030】アミン官能基を9-フルオレニルメトキシカルボニル基で保護したアミノ酸[以下Fmoc-アミノ酸またはFmoc-固有のアミノ酸の名称(例えば、Fmoc-アスパラギン)と記載することがある]に、N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを添加して所望のアミノ酸の無水物を生成させ、このFmoc-アミノ酸無水物を合成に用いた。ペプチド鎖を製造するためにC-末端のアス*

*バラギン残基に相当するFmoc-アスパラギン無水物を、そのカルボキシル基を介し、ジメチルアミノピリジンを触媒としてウルトロシンA樹脂(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製)に固定する。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミン官能基の保護基を除去する。のちアミノ酸配列のC-末端から2番目に相当するFmoc-アルギニン無水物を前記C-末端アミノ酸残基を介して樹脂に固定されたアルギニンの脱保護アミン官能基にカップリングさせた。以下同様にして順次グルタミン、トリプトファン、グルタミン、およびフェニルアラニンを固定した。全部のアミノ酸のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、94%TFA、5%フェノール、および1%エタジオールからなる溶媒でアセトアミドメチル以外の保護基の除去およびペプチドの脱離を行ない、高速液体クロマトグラフィーによりペプチドを精製し、この溶液を濃縮し、乾燥して、ペプチド粉末を得た。

【0031】前記のペプチドについてアミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析し、配列番号10のアミノ酸配列を有することを確認した。

【0032】

【実施例】次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

実施例1

注射用水(大塚製薬社製)1mlに、参考例1と同一の方法により製造した配列番号26のペプチド粉末1mgおよび塩化ナトリウム(和光純薬工業社製)9mgの割合で溶解し、水酸化ナトリウム(和光純薬工業社製)および塩酸(和光純薬工業社製)でpHを約7に調整し、逕過滅菌し、常法により1mlずつアンフルに充填し、注射用の狭心症治療薬を製造した。

実施例2

注射用水(大塚製薬社製)1mlに、参考例2と同一の方法により製造した配列番号10のペプチド粉末10mgおよびD-マンニット(和光純薬工業社製)49.5mgの割合で溶解し、リン酸緩衝剤粉末(和光純薬工業社製)の水溶液でpHを約7に調整し、逕過滅菌し、常法により1mlずつバイアル瓶に充填し、凍結乾燥し、注射用の狭心症治療薬を製造した。

実施例3

1錠当り次の組成からなる錠剤の狭心症治療薬を次の方法により製造した。

【0033】

配当番号26のペプチド	10.0 (mg)
乳糖一水和物(和光純薬工業社製)	30.0
トウモロコシデンプン(和光純薬工業社製)	19.8
結晶セルロース(旭化成社製)	28.0
珪酸マグネシウム五水和物(和光純薬工業社製)	2.0

13

ステアリン酸マグネシウム(和光純薬工業社製)

14

0.2

参考例1と同一の方法により製造した配列番号26のペプチド、乳糖一水和物、トウモロコシデンブレンおよび結晶セルロースの混合物に、滅菌精製水を適宜添加しながら均一に混練し、50℃で3時間乾燥させ、得られた乾燥物に珪酸マグネシウム五水和物およびステアリン酸マグネシウムを添加して混合し、常法により打錠器で打錠した。

【0034】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明は、ペプチド類を有効成分とする狭心症治療剤に係るものであり、この発明によって奏せられる効果は次のとおりである。(1) 毒性および副作用が少ない。

(2) 耐熱性があり、水に可溶性で、水溶液中で安定なため、薬剤として安定である。

(3) ペプチドは抗菌作用を有するので、製剤化に当り防腐剤を使用する必要がない。

【0035】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0036】

配列:

Lys R01 R01 R01 R01 R01 Gln R01 R01 Met Lys Lys
1 5 10

配列番号: 2

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0037】

配列:

Lys R01 R01 R01 R01 Gln R01 R01 Met Arg Lys
1 5 10

配列番号: 3

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01

*はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0038】

配列:

Arg R01 R01 R01 R01 Arg

1 5

配列番号: 4

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

10 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0039】

配列:

Lys R01 R01 R01 R01 Arg

1 5

配列番号: 5

20 配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0040】

配列:

Lys R01 R01 R01 R01 Lys

1 5

配列番号: 6

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0041】

40 配列:

Arg R01 R01 R01 R01 Lys

1 5

配列番号: 7

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

* 50

【0042】

配列:

Arg R01 R01 R01 Arg

1 5

配列番号: 8

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0043】

配列:

Lys R01 R01 R01 Arg

1 5

配列番号: 9

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0044】

配列:

Arg R01 R01 R01 Lys

1 5

配列番号: 10

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0045】

配列:

Phe Gln Trp Gln Arg Asn

1 5

配列番号: 11

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0046】

配列:

Phe Gln Trp Gln Arg

1 5

配列番号: 12

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0047】

配列:

Gln Trp Gln Arg

1

配列番号: 13

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0048】

20 配列:

Trp Gln Arg

1

配列番号: 14

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

30 【0049】

配列:

Arg Arg Trp Gln Trp

1 5

配列番号: 15

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

40 配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0050】

配列:

Arg Arg Trp Gln

1

配列番号: 16

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

50 配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラ

17

グメントとして含むペプチド。

【0051】

配列:

Trp Gln Trp Arg

1

配列番号: 17

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0052】

配列:

Gln Trp Arg

1

配列番号: 18

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0053】

配列:

Leu Arg Trp Gln Asn Asp

1

5

配列番号: 19

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0054】

配列:

Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro

1

5

10

15

Ser Ile Thr Cys Val

20

配列番号: 23

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

* 配列:

Leu Arg Trp Gln Asn

1

5

配列番号: 20

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラ

10 グメントとして含むペプチド。

【0055】

配列:

Leu Arg Trp Gln

1

配列番号: 21

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

20 配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0056】

配列:

Arg Trp Gln

1

配列番号: 22

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

30 配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、2番の Cysと19番の Cysがジスルフィド結合している。

【0057】

*

※配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において Cys* は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

※ 【0058】

配列:

Lys Cys* Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro

1

5

10

15

Ser Ile Thr Cys* Val

20

(11)

特開平7-278011

19

20

配列番号：24
 配列の長さ：20
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド

* 配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、2番の Cysと19番の Cysがジスルフィド結合している。
 【0059】

*

配列：

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro
 1 5 10 15
 Pro Val Ser Cys Ile
 20

配列番号：25
 配列の長さ：20
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド

※ 配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列においてCys*は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

※ 【0060】

配列：

Lys Cys* Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro
 1 5 10 15
 Pro Val Ser Cys* Ile
 20

配列番号：26
 配列の長さ：25
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド

★ 配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、3番の Cysと20番の Cysがジスルフィド結合している。
 【0061】

★

配列：

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
 20 25

配列番号：27
 配列の長さ：11
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド

☆ 配列の長さ：38

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、16番の Cysと33番の Cysとがジスルフィド結合している。

【0062】

配列：

Lys Thr Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys 40
 1 5 10

【0063】

配列番号：28

☆

配列：

Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser
 20 25 30
 Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
 35

配列番号：29

◆50◆配列の長さ：32

(12)

特開平7-278011

21

22

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラ*

*グメントとして含むペプチド。下記配列において、10番の Cysと27番の Cysとがジスルフィド結合している。

【0064】

配列：

Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp
1 5 10 15
Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg
20 25 30
Ala Phe

配列番号：30

配列の長さ：47

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラ

グメントとして含むペプチド。下記配列において、配列※

※の長さ36であって9番、26番、及び35番に Cysを有するペプチドの、9番の Cysと26番の Cysとがジスルフィド結合し、上記配列の長さ36のペプチドの35番の Cysが、配列の長さ11であって10番にCysを有するペプチドの10番の Cysとがジスルフィド結合している。

【0065】

配列：

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn
1 5 10 15
Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp
20 25 30
Ser Pro Ile Gln Cys Ile
35
Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala
1 5 10

配列番号：31

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラ★

★グメントとして含むペプチド。下記配列において、R01は Cysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0066】

30 配列：

Lys R01 R01 R01 Lys
1 5

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

C07K 5/103
5/11
5/113
5/117
7/06
7/08
14/47

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

ZNA

(72)発明者 高瀬 光徳

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業
株式会社食品総合研究所内

(72)発明者 折笠 修三

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業
株式会社食品総合研究所内